

München. 1960

**Über den Einfluß von Mn^{++}
auf die Fettsäuresynthese**

Manfred Völk



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER
MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. med. W. Seitz

**Über den Einfluß von Mn^{++}
auf die Fettsäuresynthese**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Manfred Völk
aus Schrobenhausen/Obb.

München
1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. med. W. SEITZ

Dekan: Professor Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 28. JUNI 1960



Die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden im Isotopenlaboratorium der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in München unter der Leitung von Frau Dr. Dr. V. von BRAND durchgeführt.

Ihr bin ich für die wertvollen Ratschläge ebenso wie Herrn Professor Dr. W. SEITZ für die großzügige Überlassung eines Arbeitsplatzes zu besonderem Dank verpflichtet.

Für die freundliche Unterstützung bei allen Versuchsarbeiten möchte ich Fräulein I. THÖRING und Fräulein B. von KUTZSCHENBACH herzlich danken.

INHALT

	Seite
I. EINLEITUNG	
1. Der allgemeine Fettstoffwechsel unter besonderer Berücksichtigung der Fettsäuresynthese	7
2. Der Fettstoffwechsel in der Leber	12
II. PROBLEMSTELLUNG	15
III. METHODIK	17
1. Darstellung des Enzymsystems	18
2. Inkubation	19
3. Isolierung der synthetisierten ^{14}C -Fettsäuren	20
4. Bestimmung der Radioaktivität	20
5. Reagentien	21
IV. VERSUCHSERGEBNISSE	
1. Versuchsansätze mit Mn^{++} -haltigem Puffer	21
2. Versuchsansätze mit Zusatz von wässriger MnCl_2 -Lösung ..	23
a) Normaltiere	23
b) Hungertiere	28
V. DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE	31
VI. ZUSAMMENFASSUNG	35
LITERATURVERZEICHNIS	37

I. EINLEITUNG

1. Der allgemeine Fettstoffwechsel unter besonderer Berücksichtigung der Fettsäuresynthese

Fette sind als Glycerin-Ester (Glyceride) der höheren Fettsäuren definiert. Man nahm bisher an, daß die Phosphatide und die Cholesterin-Ester die Transportform der Fette sind. Die mit der Nahrung aufgenommenen Fette werden im Dünndarm unter der Wirkung der Lipasen hydrolytisch in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Das Glycerin ist wasserlöslich und leicht resorbierbar. Die Fettsäureresorption erfolgt wahrscheinlich unter der Mitwirkung von Cholesterin und Gallensäure. Nach der Resorption in den Darmzotten wird in den Darmzellen aus den Spaltprodukten wieder Fett aufgebaut, vielleicht unter intermediärer Bildung von Phosphatiden. Diese Fette werden dann den Depots zugeführt (Depotfett). Nach Bedarf erfolgt Mobilisierung und Umwandlung zu art- und organspezifischen Fetten in der Leber (Organfett).

Aus der Tatsache, daß man Tiere durch reichliche Kohlenhydrat- oder Eiweißzufuhr mästen kann, geht hervor, daß Fettsäuren in großem Umfang aus Kohlenhydraten und Eiweiß über die C_2 -Bruchstücke gebildet werden können.

Zunächst soll auf den Abbau der Fettsäuren eingegangen werden. Die Fettsäuren werden zu $CO_2 + H_2O$ verbrannt. Dabei werden die Ketten der Fettsäuren im Verlauf des oxydativen Abbaus allmählich verkürzt. Früher hat man versucht, die beim Fettsäureabbau auftretenden Bruchstücke dadurch zu erfassen, daß man in das Molekül schwer verbrennbare Reste einführte. Diese Methode - hauptsächlich von KNOOP angewandt - geht von der Beobachtung aus, daß Verbindungen, die den Benzolkern enthalten, nur am aliphatischen Teil des Moleküls vom Organismus angegriffen werden. Man kann also dem Versuchstier solche mit einem "Index" versehene Moleküle verfüttern und dann im Harn nach ihren Spaltprodukten suchen. Es hat sich gezeigt, daß die Fettsäuren in einer höchst charakteristischen Art stufenweise abgebaut werden. Auf jeder Abbaustufe erfolgt eine Verkürzung der Kohlenstoffkette um zwei Glieder. Es entsteht die um zwei C-Atome ärmere Fettsäure. KNOOP fand als Zwischenprodukte β -Ketosäuren. Die Fettsäure wird jeweils am β -C-Atom oxydiert. KNOOP nannte deshalb diese Erscheinung β -Oxydation (10).

Erst die Verwendung von Isotopen zur "Markierung" von organischen Verbin-

dungen hat es in neuerer Zeit ermöglicht, Bruchstücke oder Umwandlungsprodukte von Molekülen, die im Stoffwechsel umgesetzt worden sind, mit Sicherheit als solche zu erkennen.

SCHÖNHEIMER und RITTENBERG (16) verabreichten Mäusen schweres Wasser (D_2O) in solchen Mengen, daß der Deuteriumgehalt der Körperflüssigkeit ungefähr konstant blieb. Unter diesen Versuchsbedingungen betrug der Deuteriumgehalt des Fettsäuren-Wasserstoffs nach einigen Tagen die Hälfte des Deuteriumgehaltes des Körperwassers, was einer Halbwertszeit von wenigen Tagen für die Körperfettsäuren entspricht.

Später untersuchten STETTEN und BOXER (16) mittels der gleichen Indikatormethoden die Erneuerung der Leberfettsäuren. STETTEN und BOXER fanden eine Halbwertszeit von 1,9 Tagen.

Durch Versuche an lebenden Ratten (RITTENBERG und BLOCH 1945) und in vitro an Leberschnitten (DIHL und BLOCH 1950) konnte Acetat als wichtige Ausgangssubstanz der Fettsäuren nachgewiesen werden. Nach Verabreichung von Na-Acetat, welches sowohl mit Deuterium, als auch mit ^{13}C markiert war, wurden in den isolierten Körperfettsäuren beide Indikatoren gebunden.

RITTENBERG und BLOCH (1945) folgerten daraus, daß beide C-Atome des Essigsäuremoleküls an der Bildung der Fettsäuremoleküle teilnehmen, und zeigten, daß jedes zweite C-Atom des Fettsäuremoleküls markiert ist. Diese Ergebnisse machten u. a. die Forschung auf die bedeutungsvolle Rolle der Essigsäure innerhalb des Stoffwechsels aufmerksam (16).

Man weiß heute, daß die Synthese der höheren Fettsäuren durch einfache Umkehr der β -Oxydation zustandekommt. Dabei reagieren aber nicht - und das ist der Kernpunkt der LYNEN'schen Untersuchungen - die freien Fettsäuren.

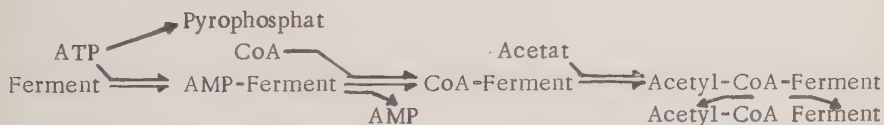
Die Erkenntnisse über das Zusammenspielen von Fermenten und Cofermenten in der lebenden Zelle zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels sind in jüngster Zeit ganz wesentlich bereichert worden durch die Entdeckung eines neuen derartigen Wirkstoffs, welcher vor 15 Jahren in Amerika gefunden wurde und die Bezeichnung Coenzym A erhielt. Die Entdeckung des CoA erfolgte fast gleichzeitig und unabhängig von einander durch NACHMANN-SOHN bei Studien über die Biosynthese des Acetylcholins und durch LIPMANN in Untersuchungen über die Acetylierung von Sulfonamiden. Man kann - generell gesprochen - das CoA als das Coferment der Acylierungsvorgänge bezeichnen (49).

Für die Frage nach dem Prinzip der Stoffwechselwirkung des CoA war es von entscheidender Bedeutung, als LYNEN in der freien SH-Gruppe des Cysteaminanteils des CoA den eigentlich funktionellen Bestandteil dieser Verbindung erkannte (29, 30). So ist es jene SH-Gruppe, derer sich die Natur bedient, um hier die Carboxylgruppe der Essigsäure oder anderer Carbonsäuren anzulagern, eine Bindungsform, wie sie aus der organischen Chemie als Thioester- oder Acyl-Mercaptanbindung bekannt ist.



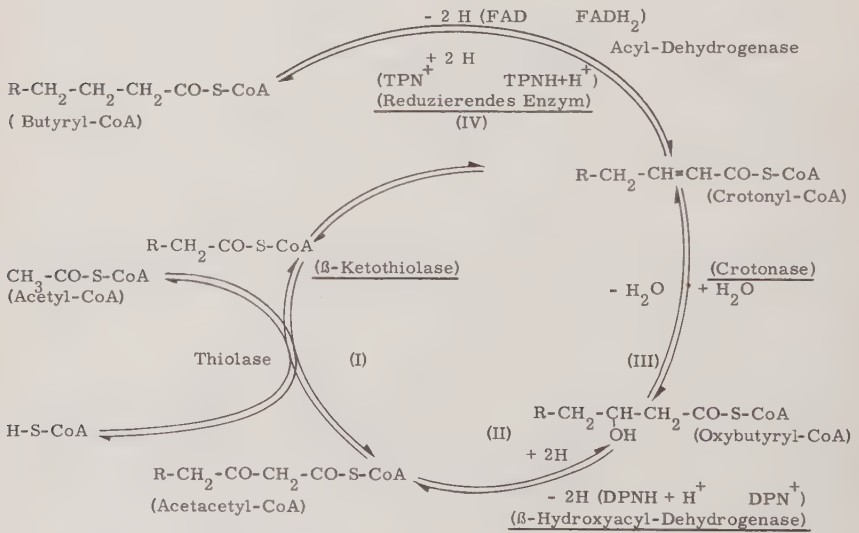
Mit der Auffindung dieser Acyl-Mercaptanbindung hat LYNEN gleichzeitig einen neuen Typ energiereicher Verbindungen der lebenden Zelle entdeckt, denn ihre Spaltung liefert etwa den gleichen Energiebetrag, wie er beim Zerfall von ATP frei wird, also etwa 12 000 cal je Mol. In der Tat sind inzwischen auch Wege erkannt worden, auf denen eine Zelle die ATP-Energie in diejenige der Acyl-S-Bindung überführen kann und umgekehrt. Aber auch andere exergone Stoffwechselprozesse können direkt zum Aufbau der Acyl-S-Bindung führen. Auf diese Weise kommt es zur "Aktivierung" an sich wenig reaktionsfreudiger Verbindungen, zur Bildung von Acyl-CoA-Derivaten, welche nun ihrerseits den Acylrest im Zuge entsprechender Sekundärreaktionen auf geeignete Acceptoren weitergeben können.

Betrachten wir als einfachsten Fall den Umsatz von freier Essigsäure im Stoffwechsel. Diese an sich wenig reaktionsfähige Substanz muß, um am allgemeinen Stoffwechsel teilnehmen zu können, erst "aktiviert" werden. Dies geschieht auf dem Weg über den Aufbau der Acetyl-S-Bindung des CoA. Die hierfür benötigte Energie wird aus der gleichzeitig erfolgenden Spaltung von ATP zur Verfügung gestellt. ATP wird hierbei nicht in der gewohnten Weise zu ADP und anorganischen Orthophosphat, sondern an einem anderen Teil des Moleküls zu Adenosinmonophosphat (AMP) und Pyrophosphat (PP) gespalten (12).



Im Gegensatz hierzu sind andere zur Bildung von Acetyl-CoA führende Reaktionen nicht an die Gegenwart von ATP gebunden, wie z. B. die Umwandlung von Brenztraubensäure in Acetyl-CoA. Hier wird die erforderliche Energie für den Aufbau der Acyl-S-Bindung aus der gleichzeitig erfolgenden

oxydativen Decarboxylierung von Brenztraubensäure gewonnen (49). Ein weiterer Weg, welcher zur Entstehung von Acetyl-CoA führt, ist der Abbau höherer Acyl-CoA-Derivate. Nur derartige, über die SH-Gruppe des CoA gebundene und damit "aktivierte" Fettsäuren können von der Zelle auf- und abgebaut werden. Man ist heute in der Lage, den genaueren Mechanismus dieser Vorgänge zu übersehen. Es handelt sich auch hier um eine Art Kreisprozeß, den sog. Fettsäurecyclus (FSC), der kurz an Hand des folgenden, von LYNEN aufgestellten Schemas besprochen werden soll (40). Streng genommen handelt es sich weniger um einen Cyclus, als vielmehr um einen spiralenförmigen Prozeß, weil die Kettenlänge der als Zwischenprodukt auftretenden Acyl-CoA-Derivate zu- oder abnimmt.



Verfolgt man dieses Schema in Richtung der Fettsäuresynthese, so besteht der erste Schritt in einer Kondensationsreaktion, bei welcher sich zwei Moleküle Acetyl-CoA vereinigen unter Bildung von Acetacetyl-CoA und freiem CoA (I). Ein für diese Reaktion verantwortliches, aus Leber isoliertes Enzym, erhielt die Bezeichnung β -Ketothiolase. Diese Bezeichnung ist zu verstehen aus der Umkehrung dieser Reaktion, der thiolytischen Spaltung von Acetacetyl-CoA $\rightleftharpoons 2$ Acetyl-CoA. Dieses Ferment bildet sich außerdem in Niere, Nebenniere und Herzmuskel (30).

Den nächsten Schritt auf dem Weg zur Fettsäuresynthese bildet die Hydrierung des Acetacetyl-CoA zur entsprechenden β -Oxyverbindung, dem β -Oxybutyryl-CoA (II). Diese Reaktion wird katalysiert durch ein ebenfalls aus der Leber isoliertes Enzym, die β -Hydroxyacyl-Dehydrogenase. Dieses Enzym wurde in der Zwischenzeit ebenfalls in verschiedenen Organen von Mensch und Tier nachgewiesen. Als Wasserstoffdonator dient die Codehydrase I (DPN).

In der dritten Stufe des FSC erfolgt Wasserabspaltung aus dem β -Oxybutyryl-CoA, wodurch unter Bildung einer Doppelbindung Crotonyl-CoA (III) entsteht. Das Enzym dieser Reaktion, Crotonase, wurde ebenfalls aus Leber und Herzmuskel isoliert und in jüngster Zeit als erstes der Fermente des FSC kristallisiert (49).

In einer letzten Reaktion wird schließlich die Doppelbindung des Crotonyl-CoA wieder hydriert unter Bildung von Butyryl-CoA (IV). SEUBERT, GREULL und LYNEN (40) fanden, daß bei der Biosynthese der Fettsäuren ein neues Enzym beteiligt ist, das den Wasserstoff von reduziertem Triphosphorpyridin-nucleotid (TPNH) auf α , β -ungesättigtes Acyl-CoA überträgt. Dieses neue Enzym, das vorläufig als "reduzierendes Enzym des Fettsäurecyclus" bezeichnet wird, tritt bei der Synthese der Fettsäurekette an die Stelle der beim Abbau tätigen Acyldehydrogenasen. Als Coferment der Wasserstoffübertragung beim Abbau ist Flavinadenindinucleotid (FAD) wirksam.

Mit diesen vier Schritten ist der FSC einmal durchlaufen, dabei ist aus 2 Molekülen "aktivierter" Essigsäure 1 Molekül der um 2 C-Atome verlängerten aktivierten Buttersäure neben freiem CoA entstanden. Nunmehr kann Butyryl-CoA von neuem mit Acetyl-CoA zusammentreten, wieder werden die vier Stufen des Cyclus durchlaufen und auf diese Weise erfolgt mit jedem Turnus des FSC eine Verlängerung der Fettsäurekette um 2 C-Atome, bis schließlich, zum Beispiel nach achtmaliger Wiederholung, das Stearin-

säuremolekül (18 C) in Form des Stearyl-CoA aufgebaut ist.

Der Abbau der Fettsäuren erfolgt durch einfache Umkehr dieses Kreisprozesses, es entsteht schließlich wieder "aktivierte" Essigsäure, die dann über den Citronensäurecyclus endgültig verbrannt wird.

Nur an das CoA gebundene Fettsäuren werden im FSC umgesetzt. Dies setzt aber voraus, daß die Fettsäuren, wie sie durch exogene Zufuhr in den Körper gelangen, zunächst in diese Bindung übergeführt, also "aktiviert" werden müssen. Genau, wie aus Essigsäure, ATP und CoA Acetyl-CoA aufgebaut werden kann, vermag die Zelle auf diese Weise auch höhere Acyl-CoA-Derivate zu synthetisieren. Mehrere hierfür verantwortliche Enzyme sind in letzter Zeit in tierischer Leber nachgewiesen worden. So fanden amerikanische Autoren ein solches "Fettsäuren aktivierendes Enzym", welches auf Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 4 - 12 C-Atomen eingestellt ist und sowohl gesättigte, als auch ungesättigte und β -Oxysäuren mit ATP zur Reaktion bringt. Ein weiteres derartiges Enzym aktiviert die längeren Fettsäuren von C^{14} - C^{18} , ³², ³³, (49).

2. Der Fettstoffwechsel in der Leber

Da bei den vorliegenden Versuchen Fermentpräparationen aus Leber als fettsäuresynthetisierendes Enzymsystem verwendet wurden, ist der Fettstoffwechsel speziell dieses Organs von besonderem Interesse.

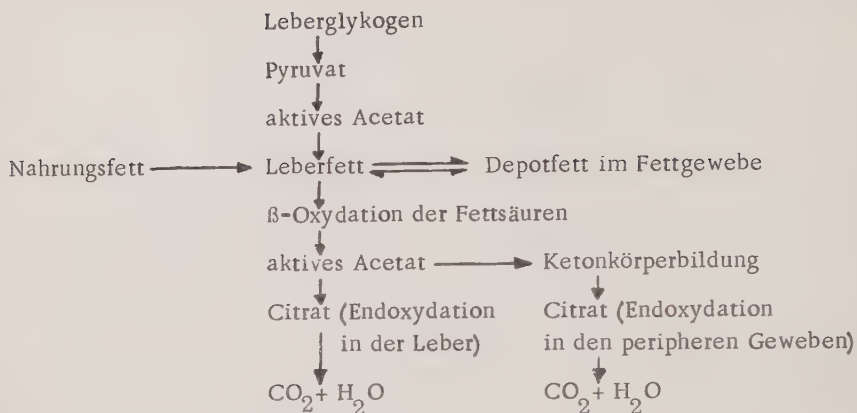
In der normalen, in situ befindlichen Leber gehen Abbau und Synthese von Fettsäuren ständig und mit großer Geschwindigkeit vor sich. Nicht nur die Halbwertszeit der Phosphatide, sondern auch die der Triglyceride und der in ihnen enthaltenen Fettsäuren ist in der Leber weit kürzer als in anderen Organen. Wird zu Schnitten von Lebergewebe Acetat zugegeben, das ^{14}C enthält, so bilden sie unter sonst gleichen Versuchsbedingungen mehr ^{14}C -haltige Fettsäuren als Gewebsschnitte anderer Organe (MEDES, THOMAS und WEINHOUSE, 1952).

Fettsäurebildung und Fettsäureabbau laufen in der Leber meist gleichzeitig nebeneinander her. Auch im Hunger hört die Leber nicht auf neue Fettsäuren zu bilden, und auch während der Kohlenhydratmast werden in der Leber ständig Fettsäuren abgebaut. Nur das Überwiegen des Abbaus über die Fettsynthese kennzeichnet den Vorgang der Abmagerung. Fettansatz ist die Folge einer gesteigerten Synthese von Fett bei weiterbestehendem Fettabbau. Daß Fettsäureabbau und Fettsäuresynthese in den Leberzellen gleichzeitig

erfolgen, geht auch aus Versuchen hervor, bei denen Leberschnitten Octansäure zugeführt wurde, deren COOH-Gruppe mit ^{14}C markiert war (12). Aus dieser Octansäure bildeten die Leberschnitte höhere Fettsäuren, bei denen der ^{14}C -Gehalt der COOH-Gruppe etwa doppelt so groß war, wie der durchschnittliche ^{14}C -Gehalt der CH_2 -Gruppen. Wäre die Octansäure durch einfache Kettenverlängerung in Palmitin- oder Stearinsäure umgewandelt worden, so hätte der ^{14}C in einer der CH_2 -Gruppen dieser Säuren enthalten sein müssen. Die Tatsache, daß der ^{14}C aus dem Carboxyl der Octansäure in das Carboxyl der Palmitin- und Stearinsäure übergegangen war, beweist, daß ein großer Teil des Octanats in den Leberzellen zuerst zu Acetat aufgespalten und erst das so gebildete Acetat zur Bildung höherer Fettsäuren verwendet worden war (BRADY, GURIN, 1950).

Fettabbau und Fettbildung erfolgen in der gleichen Zelle und zur gleichen Zeit nebeneinander. Zahlreiche Befunde weisen ferner darauf hin, daß Fettbildung und Fettabbau in verschiedenen Teilen derselben Leber und in verschiedenen Zellgruppen innerhalb desselben Leberläppchens ein sehr verschiedenes Ausmaß erreichen. Die Nahrungs- und Sauerstoffversorgung der peripheren und zentral gelegenen Zellen der Leberläppchen ist sehr verschieden, so daß gleichzeitig in einem Teil des Läppchens die Fettsynthese, in einem anderen der Fettabbau überwiegen kann. Aus der Summe all dieser in den einzelnen Zellen oft und in verschiedener Richtung verlaufender Abbau- und Synthesevorgänge setzt sich die Endbilanz des Fettstoffwechsels der Gesamtleber zusammen.

Die Leber ist die wichtigste Fettbildungsstätte des Organismus. Die Hauptmenge des in den peripheren Fettdepots des Mesenteriums, der Subcutis usw. abgelagerten Fettes ist in der Leber entstanden und auf dem Blutweg in die Fettgewebe transportiert worden. Ein Überblick über die Stellung der Leber bei der Fettbildung und beim Fettabbau wird durch folgendes Schema vermittelt (12).



Es scheint, daß als Endprodukt der Fettsäuresynthese in der Leber vor allem Palmitinsäure- und Stearinsäure-CoA entstehen, die sodann durch Veresterung in Glyceride oder Phosphatidsäuren umgewandelt werden. Ein Teil dieser Säuren wird nach der Loslösung von CoA zu Olein- oder Palmitoleinsäure dehydrogeniert (12).

Mit Hilfe der Isotopentechnik kann die Fettbildung an Leberschnitten, in Leberhomogenaten und an isolierten Lebermitochondrien verfolgt werden. Leberschnitte von Ratten bilden aus D-Acetat deuteriumhaltige Fettsäuren (BLOCH, BOREK und RITTENBERG, 1946). Ebenfalls werden aus ¹⁴C-Acetat in Rattenleberschnitten ¹⁴C-haltige Fettsäuren gebildet (BLOCH, KRAMER, CHERNICK, CHAIKOFF, 1949).

Die Fettsäurebildung aus Acetat ist von dem Ausmaß des Glucoseabbaus und des Pyruvatangebots im Lebergewebe abhängig (12). In Leberschnitten unterernährter oder völlig hungernder Ratten war die Fettsynthese aus ¹⁴C-Acetat herabgesetzt. Wurde das ¹⁴C-Acetat eine Stunde nach der letzten Nahrungsaufnahme intraperitoneal injiziert, so wurde vier Stunden später 0,35 % der injizierten Menge in den Leberfettsäuren aufgefunden, erfolgte die Injektion nach achtzehnstündigem Hunger, so betrug die für die Bildung der Leberfettsäure verwendete Menge des ¹⁴C-Acetats nur 0,06 % der verabreichten Dosis (HUTCHENS, van BRIGGEN, COCKBURN und WEST, 1954). Die hierbei noch verbleibende Glykolyse gewährleistet also nur noch in geringem Umfang den Einbau von ¹⁴C-Fettsäuren.

Das bisher Beschriebene gibt Aufschluß über die in vitro sich abspielenden Vorgänge bei der Fettsynthese unter besonderer Berücksichtigung der Leber.

II. PROBLEMSTELLUNG

Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, den Einfluß des Schwermetalls Mn^{++} in Form des $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ auf den Ablauf der Fettsäuresynthese in vitro zu untersuchen. Daß Mn^{++} bei biologischen Reaktionen bestimmte Funktionen erfüllt, ist bekannt. Mn^{++} ist in besonders großer Menge in der Leber vorhanden. Man findet hohe Werte beim Schwein, mittelhohe beim Schaf, Rind und Kaninchen und niedrige beim Menschen. In der Trockensubstanz menschlicher Lebern wurden 7 mg Mn^{++} /kg und nach anderen Untersuchungen 8,4 mg Mn^{++} /kg gefunden (12).

B. RICHARDS, M. RICHARDS und HELLERMAN (36, 37) machten die Feststellung, daß Mn^{++} für die Wirkung der Leberarginase notwendig ist. So kann z. B. mehrere Wochen lang bei 0 Grad dialysierte und damit inaktiv gemachte Arginase durch Spuren von Mn^{++} -Ionen wieder voll aktiviert werden. Mn^{++} tritt in der Wirkungsgruppe des harnstoffbildenden Enzyms, der Arginase, auf.

Bei der Fraktionierung fermentativ wirksamer Leberextrakte geht fast alles in der Leber enthaltene Mn^{++} in die Fraktion über, die auch die Arginase enthält (44).

Das Mn^{++} , das kombiniert mit Fe^{++} und Cu^{++} eine die Erythropoese steigernde Wirkung hat, ist zu 0,005 - 0,02 mg pro 100 ccm im Blutserum vorhanden. Es ist auch für andere biokatalytische Vorgänge von Bedeutung. Einzelne Peptidasen, z. B. die im tierischen Organismus weit verbreitete und auch in der Fischleber nachgewiesene Leucinaminopeptidase (2, 42, 43), ferner die Desoxyribonuclease (24), das citronensäurebildende Ferment der Taubenleber (STERN, SHAPIRO und OCHOA) u. a. (22, 46) werden von Mn^{++} -Ionen in vitro aktiviert.

Bei der Decarboxylierung der Oxalbernsteinsäure, die durch die Oxalbernsteinsäurecarboxylase katalysiert wird, ist die Anwesenheit des Mn^{++} -Ions erforderlich (32). Nach neueren Untersuchungen ist auch die Wood-Werkman'sche Reaktion von der Gegenwart von Mn^{++} -Ionen abhängig (10).

Die nach P-Vergiftung auftretende Leberverfettung war bei Meerschweinchen, die gleichzeitig per os Mn^{++} -Salze erhielten, geringer als bei Tieren, die kein Mn^{++} erhielten (39). Die von Vanadium in Verbindung mit einem Leberproteid katalysierte aerobe Oxydation der Phosphorprodeide in der Leber, nicht aber der O_2 -Verbrauch der Niere und des Gehirns bei Ratten, wird

durch Mn^{++} -Konzentrationen von $m/20\ 000$ herabgesetzt (3).

Die Leber manganarm gefütterter Tiere zeigte stark verminderten Mn^{++} -Gehalt, während der Mn-Gehalt des Blutes normal war (11). Histologische Veränderungen konnten in der Leber manganarm ernährter Ratten nicht nachgewiesen werden (5). Der Ascorbinsäuregehalt des Lebergewebes war normal, jedoch war die Arginasereaktivität des Lebergewebes stark herabgesetzt und die Harnstoffausscheidung stark verringert (41). Wird dem Lebergewebe derartiger Tiere in vitro Mn^{++} zugesetzt, so wird - wie schon erwähnt - die Arginaseaktivität normal.

Radioaktives $^{56}Mn^{++}$ ging bei Ratte, Huhn, Kaninchen, Meerschweinchen und Hund in die Leber über, ein erheblicher Anteil des nach intraperitonealer Injektion sich in der Leber ansammelnden Mn^{++} wurde mit der Galle ausgeschieden (4, 15, 21, 28, 35, 43). Da die Leber und außerdem der Darm aufgenommenes Mn^{++} ausscheiden, findet sich auch parenteral verabreichtes Mn^{++} zu einem großen Teil im Stuhl wieder. Nach Aufnahme großer Mengen von Mn^{++} nahm der sonst nur geringe Mn^{++} -Gehalt der Galle (0,003 - 0,01 mg-%) bis zu 0,1 mg-% zu. Da auch der Fetus mit der Galle Mn^{++} ausscheidet, enthält das Meconium eine besonders große Menge Mn^{++} (12).

BÄSSLER und LANG (1) kamen bei Arbeiten über die Wirkung von Butazolidin im Intermediarstoffwechsel zu der Feststellung, daß die durch Butazolidin bewirkte Hemmung der Pyruvatoxydation wie der α -Ketoglutaroxydation durch Mn^{++} -Ionen aufgehoben oder verringert werden kann. Die Substratoxydation bleibt dabei durch geringe Konzentrationen an Mn^{++} ($1,66 \cdot 10^{-3}m$) uneinflusst, die Hemmung durch Butazolidin wird dagegen weitgehend aufgehoben. Bei höheren Mn^{++} -Konzentrationen ($3,3 \cdot 10^{-3}m$) wird die Substratoxydation etwas beeinträchtigt, die Butazolidinhemmung aber trotzdem rückgängig gemacht. Der Mechanismus der Mn^{++} -Wirkung ist hier jedoch nicht ganz klar.

Die Untersuchungen von HUNTER (18, 19) haben ergeben, daß Mn^{++} -Ionen einen besonders wirksamen Schutz darstellen gegen unspezifische Schädigungen von Mitochondrien, die zu Schwellung führen. Die Mitochondrien, organisierte Strukturelemente der Zelle mit ganz speziellen Stoffwechselaufgaben, wie Endoxydation der Nährstoffe und Gewinnung von energiereichem Phosphat, enthalten nachweislich verschiedene Spurenelemente, u. a. auch Mn^{++} , die hier die Rolle von Fermentkatalysatoren spielen. HUNTERS Arbeiten zeigten, daß Mitochondrien, die dem schädigenden Einfluß von Phosphat, Arsenat, Arsenit oder niederen Konzentrationen von Metallionen

wie Zn^{++} und höheren Konzentrationen von Ca^{++} ausgesetzt waren, eine Inaktivierung der DPN-abhängigen Oxydationen erfuhren. Dieser Verlust der Oxydationsfähigkeit konnte in beinahe jedem Fall durch Zusatz von Mn^{++} -Ionen wieder kompensiert werden.

LINDBERG und ERNSTER (27) sehen im Mn^{++} -Ion auf Grund experimenteller Erfahrungen einen Cofaktor der oxydativen Phosphorylierung. Mn^{++} in Konzentrationen von 0,5 bis $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ konnte die durch Ca^{++} -Ionen bei Gegenwart von Hexokinase und Glucose verursachte Hemmung der Atmung der Mitochondrien ausschalten und bei Zusatz von DPN und ATP sogar die Atmung wiederherstellen. Experimente in dieser Richtung ließen darauf schließen, daß Mn^{++} im wasserstoffübertragenden System eine bedeutende Rolle spielt.

DICKENS (9) berichtet, daß Mn^{++} -Ionen Hirnrindenstücke gegen den schädigenden Effekt von hohen Sauerstoffspannungen schützen. Er vermutet, daß der Mechanismus in einem Schutz der Sulfhydrylgruppe ($-\text{S}-\text{H}$) besteht.

Die Synthese höherer Fettsäuren aus Acetyl-CoA im Fettsäurecyclus ist, wie LYNEN et al. beschrieben, von Wasserstoffdonatoren abhängig. Der Einfluß des Mn^{++} -Ions konnte sich also auch auf dieses wasserstoffabhängige System auswirken und möglicherweise besonders gut verfolgt werden.

III. METHODIK

Wir verwendeten für unsere Fettsyntheseversuche eine Präparation aus Taubenleber, die die fettsäuresynthetisierenden Fermente enthält. Aus eingesetztem ^{14}C -Natriumacetat werden in diesem System höhere markierte Fettsäuren ($\text{C}_{16}-\text{C}_{20}$) in vitro synthetisiert. In einer früheren Arbeit von GOLDSCHMIDT, REHBERG, v. BRAND und DESING (14) wurden die synthetisierten Fettsäuren bestimmt. Dabei konnten chromatographisch sowohl die in der Taubenleber physiologischerweise enthaltenen Fettsäuren als auch die enzymatisch synthetisierten ^{14}C -Fettsäuren aufgefunden werden. Letztere lassen sich dann autoradiographisch und mit Hilfe eines Radiopapierchromatographen nachweisen und quantitativ bestimmen. Man kam zu der Feststellung, daß der Grad der Verwertung von ^{14}C -Natriumacetat Schwankungen unterliegt, wenn man das gleiche Enzymsystem aus der Leber verschiedener Tiere (Tauben) herstellt. Die Schwankungen sind nicht unbeträchtlich, jedoch werden im Mittel etwa 15 % des eingesetzten Acetats in höhere Fettsäuren eingebaut.

Da Taubenleber nur in kleinen Mengen zugänglich ist, untersuchte man auch, ob diese sich durch die Leber eines größeren Tieres (Schwein) ersetzen läßt. Dies ist zwar möglich, doch bleibt die Leistung des aus Schweineleber hergestellten Enzymsystems weit hinter der des aus Taubenleber gewonnenen zurück (etwa 5 % Einbau statt 15 %). Auch spätere Versuche mit Fermentpräparationen aus Rattenleber führten zu keinem ausreichenden Ertrag an höheren Fettsäuren.

Wir verwendeten ausschließlich Taubenleber, die infolge der hohen Aktivität des acetataktivierenden Enzymsystems in größerem Umfang freies Acetat zu höheren Fettsäuren aufzubauen vermag. Junge, bis zu 6 Monate alte Tauben, wurden vor ihrer Verwendung reichlich mit Weizenkörnern gefüttert. BRADY und GURIN (7) und auch eigene Versuche zeigten, daß reichliche Kohlenhydratzufuhr vor dem Töten der Tiere für gute Ausbeuten der Fettsäuresynthese in vitro von Vorteil sind. Hungertiere dagegen, die bei Wasser 72 Stunden gehungert hatten, ergeben unter gleichen Bedingungen nur eine sehr geringe Ausbeute an höheren Fettsäuren (v. BRAND, HELMREICH) (8).

1. Darstellung des Enzymsystems

Den durch Scherenschlag decapitierten Tauben wird die Leber entnommen (je nach Größe von 3 - 4 Tieren) und zum Schutz der wirksamen Enzyme in eiskaltes aqua dest. gebracht; anschließend wird die Leber von anhaftenden bindegewebigen Bestandteilen gesäubert und auf Filterpapier getrocknet, sodann grob zerkleinert und gewogen.

Für die Darstellung eines zellfreien löslichen Enzymsystems (Supernatant fluid) wird einer bestimmten Menge Leber im Verhältnis 1:1,5 Puffer zugesetzt (früher errechneter optimaler Wert). Die Pufferlösung setzt sich zu gleichen Teilen aus 0,085 m K_2HPO_4 , 0,009 m KH_2PO_4 und 0,07 m $KHCO_3$ zusammen. Zur weiteren Zerkleinerung (Homogenisierung) werden die Taubenlebern in kleinere Portionen unterteilt. Nach Aufnehmen in der entsprechenden Menge des Phosphat-Bicarbonat-Puffers erfolgt mit dem Handhomogenisator nach POTTER-ELVEHJEM in ca. 30 - 45 Sekunden dauernder mäßig schneller Homogenisierung die Herstellung des Leberhomogenats, wobei es zu einer weitgehenden Zerstörung der Zellwände kommt.

Das so gewonnene Leberhomogenat wird 45 Minuten bei 2 000 x g pro min. zentrifugiert. Hierbei setzen sich die Bindegewebsanteile ab und werden als Rückstand verworfen. Das Überstehende wird bei 25 000 x g pro min zentri-

fugiert. Nach 10 Minuten wird erneut der Überstand abgegossen und im Meßzylinder mit Phosphat-Bicarbonat-Puffer auf seine Endkonzentration in der Weise verdünnt, daß schließlich 2,4 ml einer Ausgangsmenge von ungefähr 1 g Leber entsprechen. Dieses Gemisch wird bei 25 000 x g pro min. weitere 60 Minuten lang zentrifugiert. Der schließlich erhaltene Überstand ist zwar von Zellbestandteilen weitgehend befreit, enthält aber noch Partikel (Mitochondrien und Mikrosomen), die sich erst bei 100 000 x g niederschlagen. Das bei BRADY und GURIN (7) geforderte Abschleudern bei 100 000 x g mußte in Ermangelung einer Ultrazentrifuge unterbleiben. Alle Arbeitsgänge werden bei 0 Grad ausgeführt.

Untersuchungen von POPJAK und TIETZ (34) über die Fettsäuresynthese an Milchdrüsen von Kaninchen haben ebenfalls ergeben, daß die Fähigkeit zur Synthese im gänzlich partikelfreien sog. "Soluble supernatant" größer ist als im vollen Homogenat.

2. Inkubation

Die eigentliche Fettsäuresynthese wird in dem Warburg-Apparat durchgeführt. Dem aus Taubenleber in der angegebenen Weise präparierten, löslichen, zellfreien Enzymsystem (supernatant fluid, später kurz mit sup. bezeichnet) werden vor der Inkubation im Warburgtrog folgende Cofaktoren zugesetzt: $MgCl_2$ und Na-Citrat. Mg^{++} aktivieren das Enzymsystem mit einer optimalen Konzentration von $6 \cdot 10^{-3}m$. 0,01 m Na-Citrat fördert den Einbau von ^{14}C -Acetat in höheren Fettsäuren, 0,02 m hemmen. Das Enzymsystem wurde daher stets durch Zusatz von Citrat in der optimalen Konzentration aktiviert. Die wirksamste Konzentration dieser Zusätze wurde in entsprechenden Versuchen früher ermittelt und stets beibehalten (8).

Im allgemeinen war die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches folgende:

$MgCl_2$	0,006 m
Na-Citrat	0,01 m
Akt. Acetat	0,008 m
Lösl. Enzymsystem	2,3 ml
Puffer bzw. $MnCl_2$ -Zusatz ..	0,1 ml
Gesamtvolumen	3,0 ml

Eine beachtliche Steigerung in der Fähigkeit, ^{14}C -Acetat in höhere Fettsäuren einzubauen, erfuhr das System unter dem Einfluß der Phosphopyridin-nucleotide. Versuche mit zunehmenden Mengen DPN bzw. DPNH ergaben

eine wachsende Ausbeute, die bei einer Konzentration von $0,8 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ ihr Optimum erreichte. Auf den Zusatz der in früheren Versuchen stets verwendeten Phosphopyridinnucleotide konnte verzichtet werden, da sich die normalerweise stets vorhandene Konzentration von DPN und DPNH als ausreichend erwies.

Das Gemisch wird in einen geeichten Warburgtrog eingebracht und 3 Stunden bei 38 Grad (also unter Körperbedingungen *in vivo*) inkubiert. Der pH -Wert des Reaktionsgemisches (7,4) soll während der 3 Stunden dauernden Inkubation annähernd konstant bleiben. Gasphase ist hierbei anaerob (Argon).

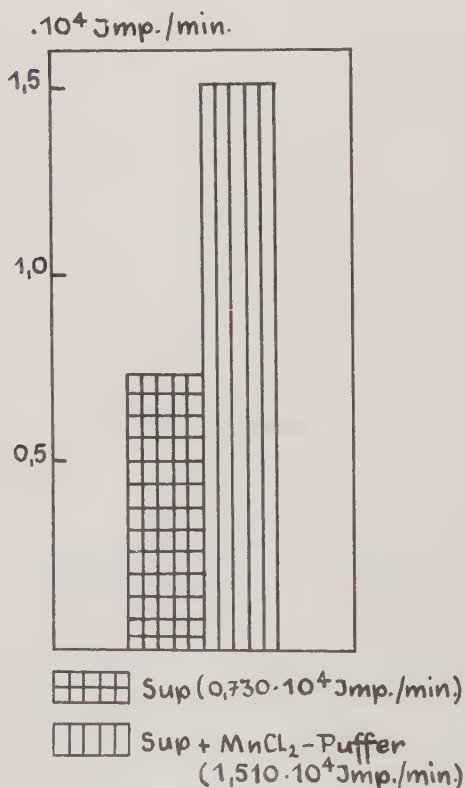
3. Isolierung der synthetisierten ^{14}C -Fettsäuren

Die Versuchsansätze wurden nach den Vorschriften von BRADY und GURIN (7) aufgearbeitet. Die 3 ml Reaktionsmischung werden aus dem Warburgkölbchen mit 5 ml aqua bidest. in ein birnenförmiges Schliffkölbchen übergespült und zusammen mit 5 ml 30 % alkohol. KOH und 25 mg Palmitinsäure als Trägersubstanz unter Rückfluß bei gelindem Sieden verseift. Nach 4 Stunden Verseifung wird die abgekühlte Lösung mit 15 - 20 ml Petroläther (Sdp. 30 bis 50 Grad) in einem Schütteltrichter vermischt und mit etwa 12 % HCl bis zum Umschlag des Indikators Bromkresylgrün-Methylorange angesäuert. Durch viermaliges Ausschütteln mit Petroläther werden die Fettsäuren aus dem Verseifungsgemisch extrahiert, dann auf dem Wasserbad eingedampft und auf 10 ml aufgefüllt. Diese 10 ml beinhalten die gesamten, aus dem Ansatz isolierten höheren Fettsäuren.

4. Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivität der im Petroläther frei vorliegenden höheren Fettsäuren wird nach der Methode von ENTENMAN (8) et al. direkt bestimmt. Von dem Petrolätherauszug wird 1 ml auf ein zur Aufnahme der Fettsäuren mit "lenspaper" belegte Aluminiumplättchen mit Rand (Durchmesser 2,5 cm) aufgetropft. Die Messung der Plättchen erfolgte mit einem β -Fensterzählrohr dünner Belegung (1 mg pro cm^2) bei stets gleicher Arbeitsspannung und gleichem geometrischen Abstand. Die Vornahme der üblichen Korrekturen erfolgte gemäß den Richtlinien im "Isotopic Carbon" unter Zugrundelegung einer Standardfolie. Die gezählte Radioaktivität wird in Impulsen pro min. angegeben. Sämtliche Werte wurden auf den Mittelwert aller Folienwerte abgestimmt.

Wie aus diesen sechs Versuchsergebnissen ersichtlich ist, zeigt die Förderung der Fettsäuresynthese eine gewisse Abhängigkeit von der Ausgangsaktivität des Enzymsystems. So fördert z. B. Mn^{++} die Fähigkeit des Systems, höhere Fettsäuren zu bilden, bei einer geringen Ausgangsaktivität wie $0,460 \cdot 10^4$ Imp./min. um ungefähr das Dreifache auf $1,508 \cdot 10^4$ Imp./min., während sich bei einer Ausgangsaktivität von $1,148 \cdot 10^4$ Imp./min. nur eine Steigerung auf $1,459 \cdot 10^4$ Imp./min. einstellt.



Nebenstehende graphische Darstellung (Abb. 1) veranschaulicht die durchschnittliche Förderung der Fettsäuresynthese durch Präparation des Enzymsystems mit Mn^{++} -haltigem Puffer bei sechs Versuchen.

Es zeigt sich hierbei, daß die beschriebene Pufferlösung die Aktivität des löslichen zellfreien Enzymsystems ungefähr auf das Doppelte zu steigern vermag.

Abb. 1: Durchschnittliche Förderung der Fettsäuresynthese durch $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ -Puffer bei Normaltieren (6 Versuche).

2. Versuchsansätze mit Zusatz von wässriger MnCl_2 -Lösung

a) Normaltiere

Bei den folgenden Versuchen wurde $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ in H_2O gelöst und in einer Menge von 0,1 ml vor der Inkubation in die Warburgkölbchen einpipettiert. Man wollte durch diese Maßnahme einer Fällung von $\text{Mn}(\text{OH})_2$ vorbeugen und damit einen mengenmäßig unkontrollierbaren Verlust von Mn^{++} durch das Zentrifugieren verhindern. Man war dadurch imstande, die Abhängigkeit der Mn^{++} -Förderung von der Konzentration des Mn^{++} zu überprüfen, ohne daß dabei ein Verlust an Mn^{++} auftritt. Verwendet wurden MnCl_2 -Konzentrationen zwischen $2,704 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ und $0,000845 \cdot 10^{-3} \text{ m}$, i. e. Endkonzentration in 3 ml Versuchsansatz.

Es zeigte sich, wie nachfolgende Kurve (Abb. 2, S. 24) veranschaulichen soll, daß Mn^{++} in niederen Konzentrationen von $0,00845 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ bis $0,0845 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ hemmenden oder kaum fördernden Einfluß auf die Höhe der Fettsäuresynthese hatte, und erst bei $0,169 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ eine sichtbare Steigerung eintrat. Bis etwa $0,507 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ verläuft die Kurve leicht ansteigend, um dann mit zunehmender Konzentration zur Ausgangsaktivität zurückzukehren. Konzentration von $3,38 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ hemmen schon.

Tabelle 2 (Seite 25) zeigt die Abhängigkeit der Höhe der Fettsäuresynthese von der Mn^{++} -Konzentration in fünf Versuchen verschiedener Ausgangsaktivität.

Das Optimum der Ausbeute an markierten höheren Fettsäuren liegt also zwischen $0,169 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ und $0,507 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ MnCl_2 . Alle weiteren Versuche wurden daher mit einer Mn^{++} -Konzentration von $200 \mu = 0,338 \cdot 10^{-3}$ angesetzt, was dem optimalen Bereich der Ausbeute entspricht und sich für die praktische Ausführung als zweckdienlich erwies.

Auch bei diesen Versuchen offenbarte sich die schon bei den Versuchen mit Mn^{++} -haltigem Puffer beobachtete Abhängigkeit der Fettsäuresyntheseförderung durch Mn^{++} von der Ausgangsaktivität des Enzymsystems. So zeigten die Versuche mit einer Ausgangsaktivität bis $1,0 \cdot 10^4 \text{ Imp./min.}$ eine Steigerung der Ausbeute an markierten höheren Fettsäuren um 106,3 % im Durchschnitt, während Ausgangswerte zwischen $1,0$ und $2,0 \cdot 10^4 \text{ Imp./min.}$ nur eine durchschnittliche Förderung der Fettsäuresynthese um 70,7 % ergaben.

TABELLE 2

Molarität der verwendeten Mn^{++} - Konzentrationen		Aktivität in Imp. $\cdot 10^4$ /min. für Ge- samtversuchsansatz				
Versuch:		1	2	3	4	5
Sup. + $0,000845 \cdot 10^{-3} m$						0,897
Sup. + $0,004225 \cdot 10^{-3} m$						0,767
Sup. + $0,00845 \cdot 10^{-3} m$					0,678	0,790
Sup. + $0,04225 \cdot 10^{-3} m$					0,889	
Sup. + $0,0845 \cdot 10^{-3} m$			2,428	1,563	1,102	
Sup. + $0,169 \cdot 10^{-3} m$				1,503	1,650	
Sup. + $0,338 \cdot 10^{-3} m$			2,353	2,458	1,750	1,380
Sup. + $0,507 \cdot 10^{-3} m$					1,852	
Sup. + $0,676 \cdot 10^{-3} m$		1,298	2,283			
Sup. + $0,845 \cdot 10^{-3} m$				2,508	1,718	
Sup. + $1,352 \cdot 10^{-3} m$		1,259				
Sup. + $1,69 \cdot 10^{-3} m$				1,628	1,082	
Sup. + $2,704 \cdot 10^{-3} m$		0,756				
Sup.		0,400	0,823	1,215	0,921	0,859

TABELLE 3

Ausgangsaktivitäten bis $1,0 \cdot 10^4$ Imp./min.

Aktivität in Imp. $\cdot 10^4$ /min. für Gesamtversuchsansatz				
Versuchsansätze				
Versuch	Sup.	Sup. + MnCl ₂	Versuch	Sup. + MnCl ₂
1	0,823	2,353	14	0,940
2	0,792	1,213	15	0,917
3	0,350	0,841	16	0,902
4	0,558	1,290	17	0,786
5	0,798	1,720	18	0,387
6	0,984	1,500	19	0,672
7	0,920	1,750	20	0,643
8	0,859	1,380	21	0,905
9	0,942	1,868	22	0,954
10	0,920	2,480	23	0,702
11	0,889	1,409	24	0,529
12	0,805	1,419	25	0,720
13	0,500	0,997	26	0,948

TABELLE 4

Ausgangsaktivitäten zwischen $1,0$ und $2,0 \cdot 10^4$ Imp./min.

Aktivität in Imp. $\cdot 10^4$ pro min. für Gesamtversuchsansatz				
Versuchsansätze				
Versuch	Sup.	Sup. + MnCl ₂	Versuch	Sup. + MnCl ₂
1	1,531	2,350	10	1,627
2	1,072	1,424	11	1,654
3	1,812	2,079	12	1,058
4	1,131	1,569	13	1,184
5	1,865	2,723		
6	1,215	1,628		
7	1,761	1,978		
8	1,459	1,763		
9	1,122	1,315		

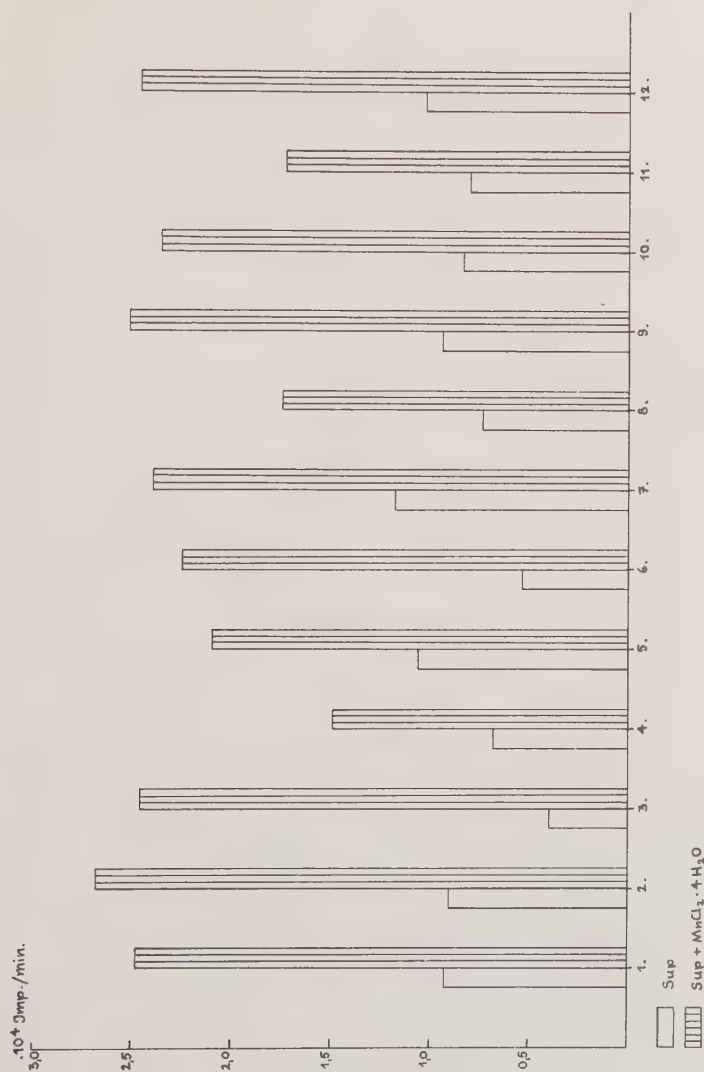


Abb. 3: Förderung der Fettsäuresynthese durch Zusatz wässriger MnCl_2 -Lösung ($0,338 \cdot 10^{-3} \text{ m}$), dargestellt durch 12 Versuche, die die beste Ausbeute lieferten.

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse in den einzelnen Versuchen bei Ausgangsaktivitäten bis $1,0 \cdot 10^4$ Imp./min.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die einzelnen Versuchsergebnisse bei Ausgangsaktivitäten zwischen $1,0$ und $2,0 \cdot 10^4$ Imp./min.

Vorstehende graphische Darstellung (Abb. 3 S. 27) zeigt die eindrucksvolle Steigerung der Fettsäuresynthese bei den zwölf Versuchen mit optimaler Ausbeute, wobei sich eine solche bis auf das Sechsfache der Ausgangswerte der Parallelversuche ohne Mn^{++} -Zusatz ergibt (Versuch 18, Tab. 3).

Die verschieden hohe Aktivität des fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems stellt eine gewisse Schwierigkeit beim Vergleich der Einzelversuche dar. Sie erklärt sich aus der unterschiedlichen Nahrungsaufnahme der Tiere und dem damit zusammenhängenden Umfang der Glykolyse. Außer dem verschieden guten Ernährungszustand dürften der augenblickliche Stand des Fettstoffwechsels, insbesondere der Umfang der Fettsäuresynthese und die Anzahl vorhandener wirksamer Enzymsysteme und deren Aktivität den Unterschied der Ausgangsaktivitäten erklären. Auch die bei den Versuchen beobachtete Abhängigkeit der Höhe der Ausbeute an markierten höheren Fettsäuren durch den Mn^{++} -Effekt von der Ausgangsaktivität des Enzymsystems ist wahrscheinlich auf die genannten Faktoren zurückzuführen.

b) Hungertiere

Frühere Versuche mit Hungertieren (48 Std. Futterentzug) zeigten eine Herabsetzung der Glykolyse und eine gleichzeitige Verminderung der Fettsäuresynthese, d. h. also eine geringe Ausbeute an synthetisierten markierten Fettsäuren.

Bei den folgenden Versuchen wurden Tauben einem 72-stündigem Hunger ausgesetzt. Die verbleibende Restglykolyse reicht offenbar nicht mehr aus, um größere Mengen aktiven Acetats in höhere Fettsäuren einzubauen. Es zeigt sich also eine deutliche Abhängigkeit der Fettsäuresynthese vom Kohlehydratabbau.

Zugesetzte Mn^{++} -Ionen zeigen auch hier einen fettsäuresynthesesteigernden Effekt, die Förderung bleibt jedoch weit hinter der bei Normaltieren zurück (Tab. 5, s. S. 29).

TABELLE 5

Versuchsansätze		Imp. · 10 ⁴ /min. für extrahierte Gesamtfettsäuren							
Versuch:		1	2	3	4	5	6	7	
Normale	MgCl ₂	0,006 m	0,058	0,059	0,045	0,086	0,048	0,059	0,138
Versuchs-	Na-Citrat	0,01 m							
ansätze	Akt. Acetat	0,008 m							
	Sup. H.	2,3 ml							
	Puffer	0,1 ml							
Versuchs-	MgCl ₂	0,006 m	0,091	0,083	0,066	0,107	0,064	0,067	0,229
ansätze mit	Na-Citrat	0,01 m							
Zusatz wäss-	Akt. Acetat	0,008 m							
riger MnCl ₂ -	Sup. H.	2,3 ml							
Lösung	MnCl ₂	0,1 ml							

Die graphische Darstellung der Durchschnittsförderung der Fettsäuresynthese bei Hungertieren (Abb. 4) spricht dafür, daß zwar eine geringfügige Steigerung der Fettsäuresynthese durch Mn^{++} -Zusatz eintritt; die durch den mangelnden anaeroben Kohlehydratabbau bedingte starke Herabsetzung der Synthesefähigkeit konnte jedoch in keinem Falle rückgängig gemacht werden. $MnCl_2$ wurde in einer Konzentration von $0,338 \cdot 10^{-3} m$ verwendet

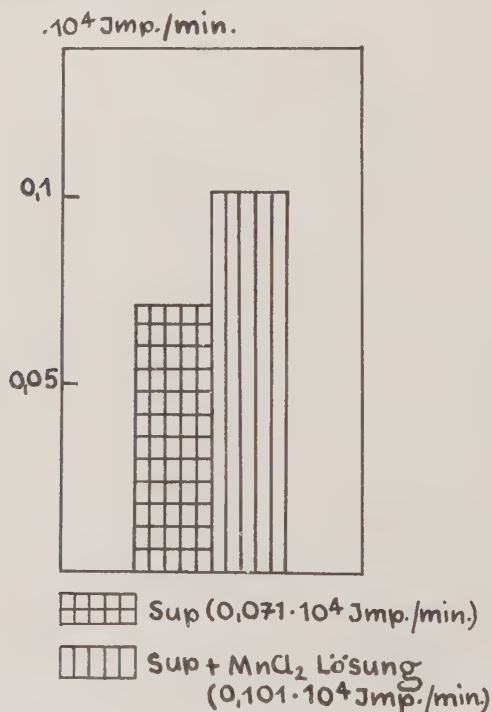


Abb. 4: Durchschnittliche Förderung der Fettsäuresynthese durch $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ -Lösung bei Hungertieren (7 Versuche).

V. DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

Aus Taubenleber bereitetes, lösliches Enzymsystem ist unter Zusatz bestimmter Cofaktoren wie Mg^{++} -Ionen und Na-Citrat imstande, ^{14}C -Acetat zu durchschnittlich 15 % der eingesetzten Menge in die Fraktion markierter höherer Fettsäuren einzubauen. Der Einbau von aktivem Acetat konnte durch Zugabe von Mn^{++} -Ionen in optimaler Konzentration maximal um das rund Sechsfache gesteigert werden. Es zeigte sich dabei eine Abhängigkeit des Mn^{++} -Effekts von der Molarität der verwendeten Mn^{++} -Lösungen. Bei Hungertieren zeigte sich dagegen eine vermehrte Fettsäuresynthese durch Zusatz von Mn^{++} -Ionen in weniger ausgeprägtem Maße.

Es ist bekannt, daß Metallionen (Kationen) wie Fe^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Mg^{++} und Mn^{++} für die Wirksamkeit von Fermenten oft unbedingt notwendig sind. Für diese Aktivierung des Ferments ist es erforderlich, daß das Metallion in das Eiweiß (Apoferment) eingebaut wird. Entfernt man das spezifische Metallion, so geht die Wirksamkeit verloren. In manchen Proteidfermenten ersetzen sie das Coferment.

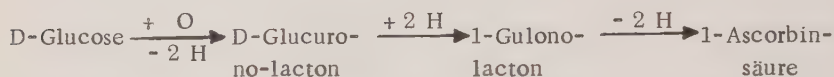
HUNTER (18) hat darauf hingewiesen, daß Mn^{++} -Ionen einen schützenden Effekt bei Mitochondrienschädigungen, die zu Schwellung derselben führen, ausüben. Weiterhin erfüllen Mn^{++} -Ionen bei vielen biologischen Reaktionen bestimmte Funktionen, wie eingangs erwähnt wurde. Das Mn^{++} -Ion scheint die Rolle eines Fermentkatalysators zu spielen. Der Verlust der Oxydationsfähigkeit von geschädigten Mitochondrien (durch Phosphat, Arsenat, Arsenit usw.) kann durch Zusatz von Mn^{++} wieder aufgehoben werden.

Die Untersuchungen von LINDBERG und ERNSTER (27) weisen auf die mögliche Bedeutung des Mn^{++} in wasserstoffübertragenden Systemen hin. Da die Höhe der Fettsäuresynthese von einem genügenden Angebot an Wasserstoff abhängt, wäre ein direkter Einfluß des Mn^{++} auf den Ablauf der Fettsäuresynthese möglich.

Die Überführung des Acetacetyl-CoA in β -Oxybutyryl-CoA (II) wird durch ein Ferment katalysiert, das LYNEN et al. (30) beschrieben und β -Hydroxyacyl-Dehydrogenase benannt haben. Als Wasserstoff-Donator für dieses Enzym wurde Dihydro-diphosphopyridinnucleotid (DPNH) nachgewiesen. Möglicherweise ist die Wirksamkeit des Mn^{++} im Fettsäurecyclus so zu erklären, daß Mn^{++} - in einem anderen Redoxsystem - die Wasserstoffüber-

tragung an das DPNH katalysiert. In gleicher Weise könnte Mn^{++} an der Wasserstoffübertragung an das TPN beteiligt sein, welches über das "reduzierende Enzym des Fettsäurecyclus" an der Synthese des Butyryl-CoA beteiligt ist.

Für diese Beteiligung von Mn^{++} an wasserstoffübertragenden Systemen spräche auch die Bedeutung von Mn^{++} bei der Ascorbinsäuresynthese (38). Hier sind katalytische Mengen von Mn^{++} erforderlich. Bei Ratten und Kaninchen entstand bei Mangel an Mn^{++} ein skorbutartiges Krankheitsbild. Andererseits konnten ascorbinsäurefrei ernährte Meerschweinchen durch Zufuhr von Mn^{++} und Glucose vor Skorbut geschützt werden. Auch diese Reaktion verläuft über eine Wasserstoffübertragung:



Die Ascorbinsäure hat die Wirkung eines Redoxsystems. Sie gehört wie Glutathion u. a. zu den sogenannten Kinasen, das sind spezifisch organisch-chemische Stoffe des Organismus, die eine auch ohne sie ablaufende Reaktion beschleunigen. Sie aktivieren die Enzyme. Manche Enzyme wirken optimal, wenn sie in höchst reduzierter Form vorliegen. Diesen Zustand führen manche Kinasen herbei, die als H-Überträger fungieren. Also auch hier läßt sich die Wirkung des Mn^{++} -Zusatzes als fördernder Effekt auf eine Wasserstoffübertragung durch ein Redoxsystem deuten.

OCHOA (38) weist auf den Einfluß von Mn^{++} auf den Übergang von Enol- in Ketoform und umgekehrt hin, was ebenfalls für einen Zusammenhang zwischen Mn^{++} und Wasserstoffübertragung spräche.

Die in unseren Versuchen festgestellte und bekannte Abhängigkeit der Fettsäuresynthese vom Umfang der Glykolyse läßt auch an eine Wirkungsspezifität des Mn^{++} im Bereich des Kohlenhydratabbaus denken.

OHLMEYER und OCHOA (33) zeigten in ihren Versuchen, daß Adenylsäure in bezug auf die Cophosphorylasewirkung reiner Cozymase etwa 60fach überlegen ist, daß dieser Unterschied aber durch Zusatz geringer Mengen Mn^{++} fast ausgeglichen wird. Dabei steigt die Aktivität der Adenylsäure auf das Fünffache, die der Cozymase auf das 200fache. Es zeigt sich auch hier ein Zusammenhang zwischen DPN-Aktivität und Mn^{++} -Anwesenheit.

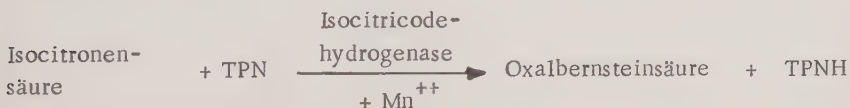
STERN, SHAPIRO und OCHOA (46) berichten, daß die Synthese der Citronensäure aus Acetat, ATP und Oxalacetat durch ein lösliches Enzymsystem aus Taubenleber die Anwesenheit von Mg^{++} oder Mn^{++} und CoA als Cofaktoren erfordert. Möglicherweise ist die Mn^{++} -Wirkung an dieser bedeutsamen Stelle des Kohlenhydratabbaus und des Citronensäurecyclus zu suchen und besteht in einer Aktivierung der Citronensäurebildung und dadurch einer Einleitung des Citronensäurecyclus, was über eine vermehrte Energiespeicherung wieder zur Fettsäuresynthese führt.

Über eine enzymatische Synthese von Citrat aus Pyruvat und Oxalacetat berichten KORKES, STERN, GUNSALUS und OCHOA (22). Das System ist wenig aktiv bei Abwesenheit von DPN, maximale Reaktionsabläufe erfordern als Cofaktoren unter anderem auch Mn^{++} und eine Dehydrogenase.

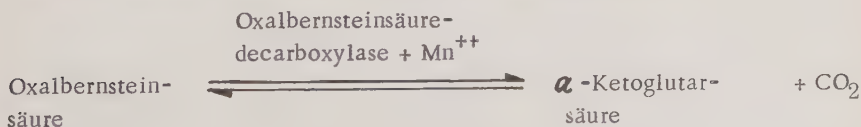
JAGANNATHAN und LUCK (20) fanden, daß die Phosphoglucomutase, welche die Einstellung des Gleichgewichts zwischen Glucose-1-phosphorsäure und Glucose-6-phosphorsäure katalysiert, durch Mn^{++} eine Aktivierung erfährt.

Ein anderer Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung und Mn^{++} ergibt sich bei der Betrachtung der Coenzym-A-Synthese aus Pantethein und ATP. Auch hier ist bei der ersten Einzelaktion der Umwandlung, der Phosphorylierung des Pantetheins, die Anwesenheit von Mn^{++} erforderlich (26).

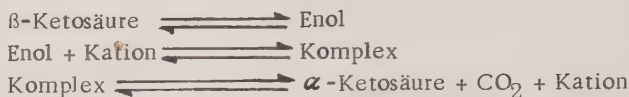
OCHOA (32) weist auf die Notwendigkeit von Mn^{++} - das sich hier viel wirksamer als Mg^{++} erweist - bei der Wirkung von Isocitriocodehydrogenase hin, welche die Reduktion von TPN katalysiert. Der Punkt allerdings, an dem das Mn^{++} angreift, blieb noch ungeklärt. Sicher ist Mn^{++} am Dehydrierungsschritt beteiligt:



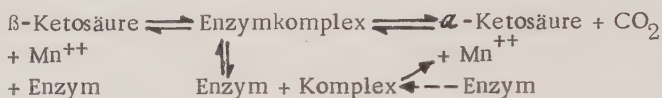
Auch die folgende Reaktion erwies sich als Mn^{++} -abhängig:



Oxalbernsteinsäuredecarboxylase scheint ein Metallprotein zu sein. Die Wirkung des Metallkomplexes scheint bei nicht enzymatischen und enzymatisch katalysierten Vorgängen unterschiedlich zu sein. Nach OCHOA spielt sich bei nicht enzymatischen Reaktionen ein Wechsel zwischen Keto- und Enolform ab, wobei das Mn^{++} mit dem Enol einen Komplex bildet:



Der Mechanismus bei enzymatischen Reaktionen ist nach KORNBERG, OCHOA und MEHLER (23) folgender:



Mn^{++} spielt demnach zweifelsohne eine große Rolle als Co-Faktor der Glykolyse, indem es bestimmte Enzyme des glykolytischen Systems aktiviert, so auch die Transphosphorylierung von Phosphobrenztraubensäure und ADP zu Brenztraubensäure und ATP (6) (BOYER, LARDY und PHILLIPS).

Ein interessanter Zusammenhang ergibt sich, wenn man den Mn^{++} -Gehalt der Netzhaut kennt (13). Die Retina gehört zu den Geweben mit einem ziemlich hohen Gehalt an Mn^{++} (FORE und MORTON). Vor den meisten anderen Geweben ist sie durch ihren großen Sauerstoffverbrauch und ihr starkes Glykolysevermögen ausgezeichnet. Diese Feststellung gründet sich vor allem auf Untersuchungen von WARBURG (48) und seinen Mitarbeitern an isolierter Netzhaut verschiedener Tiere. Versuche mit Extrakten haben gezeigt, daß auch die Retina über ein phosphorylierendes, zur Milchsäurebildung führendes Enzymsystem verfügt (31). Mg^{++} und Mn^{++} fördern in diesen Extrakten die Glykolyse (MEYERHOF und PERDIGON).

Nach OHLMEYER und OCHOA (33) wirkt Mn^{++} im Muskel ähnlich wie im Cofermentsystem der Glykolyse.

Das Ausbleiben des stark fördernden Mn^{++} -Effekts bei mangelhafter Glykolyse - also bei Hungertieren - unterstreicht die Bedeutung des Mn^{++} als aktivierender Cofaktor der Glykolyse. Gerade die noch verbleibende geringfügige Förderung der Fettsäuresynthese aber läßt an einen direkten Einfluß von Mn^{++} über Wasserstoffüberträger (Redoxsysteme) auf die wasserstoffabhängigen Reaktionen der Fettsäuresynthese als sehr wahrscheinlich denken. Die Wirkung

des Mn^{++} scheint also auf seiner Eigenschaft als aktivierender Faktor von Redoxsystemen zu beruhen, wobei sich die Beschleunigung von enzymatischen wasserstoffabhängigen Prozessen bei unseren Versuchen in einer Mehrausbeute an markierten höheren Fettsäuren ausdrückt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Einleitend wird in vorliegender Arbeit kurz der Weg aufgezeigt, den die Fettforschung bis zur Entdeckung der Fettsäuresynthese als Umkehr der β -Oxydation nach KNOOP nahm. Das Schema von LYNEN faßt die heutigen Erkenntnisse über den Ablauf der Fettsäuresynthese zusammen.

Das Kapitel über den Fettstoffwechsel der Leber nimmt Bezug auf die Verwendung von Leber als fettsäuresynthetisierende Enzyme enthaltendes System.

2. In der Problemstellung wird auf die Rolle des Mn^{++} -Ions beim Ablauf biologischer Reaktionen eingegangen und auf seine Schutzfunktion bei schädigenden Prozessen der Mitochondrien und seine bedeutsame Stellung als Cofaktor in wasserstoffübertragenden Systemen hingewiesen.
3. Für die Fettsäuresyntheseversuche wurden Taubenleberpräparationen verwendet, die infolge der hohen Aktivität des acetataktivierenden Enzymsystems dazu am geeignetsten erscheinen. Die Versuche wurden nach eigenen Erfahrungen modifiziert, im übrigen nach den Vorschriften von BRADY und GURIN ausgeführt. Den Ansätzen waren vor der Inkubation stets $MgCl_2$ 0,006 m und Na-Citrat 0,01 m zugesetzt worden. Der Zusatz von Phosphopyridinnucleotiden erwies sich dabei als nicht notwendig zur Erreichung einer ausreichenden Fettsäuresynthese. Mn^{++} wurde in Form von $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ zugegeben.
4. Die Ergebnisse zeigen einen fördernden Einfluß von Mn^{++} auf die Höhe der Fettsäuresynthese in Abhängigkeit von der verwendeten Mn^{++} -Konzentration. Als optimal für die Ausbeute an markierten, höheren Fettsäuren erweist sich die Konzentration von $0,338 \cdot 10^{-3}$ m/3 ml Versuchsansatz.

Versuche mit Ausgangsaktivitäten bis $1,0 \cdot 10^4$ Imp./min. ergeben eine Steigerung dieser Ausbeute um 106,3 %, während solche mit einer Ausgangsaktivität zwischen $1,0$ und $2,0 \cdot 10^4$ Imp./min. die Fettsäure-

synthese nur um 70,7 % durchschnittlich fördern. Im Einzelversuch wird die Mn^{++} -Wirkung besonders eindrucksvoll, wobei das zugesetzte Mn^{++} die Fettsäuresynthese unter optimalen Bedingungen bis auf das 6fache des Ausgangswertes steigert.

Versuche mit Hungertieren (72 Std.) unterstreichen die schon bekannte Abhängigkeit der Fettsäuresynthese vom Kohlenhydratabbau. Zuge-setztes Mn^{++} führt nur zu einer geringen Förderung der Fettsäuresynthese.

5. Es ist bekannt, daß Mn^{++} -Ionen neben anderen Schwermetallionen oft erforderlich für den Ablauf biochemischer Reaktionen sind oder aktivierenden Einfluß haben. Die Mn^{++} -Wirkung bei der Fettsäuresynthese beruht wahrscheinlich auf einer gesteigerten Wasserstoffbereitstellung unter Mitwirkung von Mn^{++} . Die Wasserstoffübertragung erfolgt vielleicht über ein an Mn^{++} -Anwesenheit gebundenes Redoxsystem. Der Haupteffekt des Mn^{++} ist aber möglicherweise in einer Aktivierung des Kohlenhydratabbaus und Einleitung des Citronensäurecyclus zu suchen, was auch auf Grund der Häufigkeit seines Auftretens bei diesen Reaktionsabläufen angenommen werden darf.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Bässler, K. H. und K. Lang:
Arch. exper. Path. u. Pharm. 229, 568 (1956).
2. Berger, J. and M. J. Johnson:
J. biol. Ch. 141, 921 (1941).
3. Bernheim, F. and M. L. C. Bernheim:
J. biol. Ch. 128, 79 (1939).
4. Born, H. J., H. A. Timofeeff-Rossovsky and P. M. Wolf:
Naturwiss. 31, 246 (1943).
5. Boyer, P. D., J. H. Shawand, P. H. Phillips:
J. biol. Ch. 143, 417 (1942).
6. Boyer, P. D., J. H. A. Lardy and P. H. Phillips:
J. biol. Vh. 146, 673 (1942).
7. Brady, R. O. and S. Gurin:
J. biol. Ch. 199, 421 (1952).
8. v. Brand u. E. Helmreich:
B. Z., 238, 146 (1956).
9. Dickens, F.: Biochem. J. 40, 145 (1946).
10. Edelbacher, S. - F. Leuthardt:
Lehrbuch der Physiol. Chemie.
11. Ellis, G. H., S. E. Smith, E. M. Cates, D. Lobb and E. J. Larson:
J. Nutrit. 34, 21 (1947).
12. Flaschenträger, B. u. E. Lehnartz:
Lehrbuch der Physiol. Chemie (1956).
13. Fore, H. and R. A. Morton:
Biochem. J. 51, 603 (1952).
14. Goldschmidt, St., H. Rehberg, V. v. Brand, K. H. Desing:
Chem. Berichte, Nr. 6, S. 963 - 969.
15. Greenberg, D. M., D. H. Copp and E. N. Cuthbertson:
J. biol. Chem. 147, 749 (1943).

16. v. Hevesy, G.: Doc. Rheumat. Geigy, Nr. 6, 35.
17. Hötzl, H. u. G. Laudahn:
Ärztl. Wochenschrift 29, 634 (1956).
18. Hunter, F. E.: J. biol. Ch. 216, 367 (1955).
19. Hunter, F. E., J. Davis and L. Carlat:
Bioch. et biophys. acta, vol. 20, 237 (1956).
20. Jagannathan, V. and J. M. Luck:
J. biol. Ch. 179, 561 (1949).
21. Kent, N. L. and R. A. McCane:
Biochem. J. 35, 877 (1941).
22. Korkes, S., J. R. Stern, I. C. Gunsalus and S. Ochoa:
Nature 166, 439 (1950).
23. Kornberg, A., S. Ochoa and A. H. Mehler:
J. biol. Ch. 174, 159 (1948).
24. Kunitz, M. J.: Gen. Physiol. 33, 349 (1950).
25. Lehnartz, E.: Einführung in die Physiol. Chemie (1949).
26. Leonitow, L. and G. D. Novelli:
J. biol. Chem. 207, 761 (1954).
27. Lindberg, O. u. L. Ernster:
Nature (London) vol. 17, 1038 (1954).
28. Lund, C. C., L. A. Shaw and C. K. Drinker:
J. exp. Med. 33, 231 (1921).
29. Lynen, F.: Annual Review of Biochem. vol. 24, 653 (1955).
30. Lynen, F. and S. Ochoa:
Bioch. et biophys. acta. vol. 12, 299 (1953).
31. Meyerhof, O. et E. Perdigon:
Enzymologia 8, 353 (1940).
32. Ochoa, S. and E. Weiss-Tabori:
J. biol. Ch. 174, 123 (1948).
33. Ohlmeyer, P. u. S. Ochoa:
B. Z. 293, 338 (1937).

34. Popjak, G. u. A. Tietz:
Biochem. J. 60, 147 (1955).
35. Ramage, H., J. H. Sheldon and W. Sheldon:
Proc. R. Soc. London 113, 308 (1933).
36. Richards, M. B.:
Biochem. J. 24, 1572 (1930).
37. Richards, M. M. and Hellerman:
J. biol. Ch. 134, 237 (1940).
38. Rudra, M. N.:
Current Sci. Bangalore 22, 15 (1953).
39. Sendrail, M., D. Vincent and P. Garirc, C. R.:
Soc. Biol. 137, 497 (1943).
40. Seubert, W., G. Greull u. F. Lynen:
Angew. Chem. Nr. 11, 359 (1957).
41. Skinner, J. T. and J. S. McHargue:
Trans. Kentucky Acad. Sci. 11, 47 (1944).
42. Smith, E. L.:
J. biol. Ch. 163, 15 (1946).
43. Smith, E. L. and Bergmann:
J. biol. Ch. 138, 789 (1941).
44. Shils, M. E. and McCollum:
J. Nutrit. 26, 1 (1943).
45. Stansley, G. and H. Beinert:
Bioch. et biophys. acta vol. 11, 600 (1953).
46. Stern, J. R., B. Shapiro and S. Ochoa:
Nature 166, 403 (1950).
47. Wakil, S. J., J. W. Porter and P. M. Gibson:
Bioch. et biophys. acta vol. 24, 453 (1957).
48. Warburg, O., K. Posener u. E. Negelein:
B. Z. 152, 309 (1924).
49. Wieland, O.:
Klin. Wochenschrift 17/18, 385 (1954).

LEBENS LAUF

Am 9. Oktober 1936 wurde ich als dritter Sohn des Arztes Dr. Anton VÖLK und seiner Ehefrau Magdalena, geb. Schachtner in Schrobenhausen/Obb. geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Schrobenhausen trat ich hier in die Städtische Oberrealschule ein und legte im Juni 1954 die Reifeprüfung ab.

Im Anschluß daran immatrikulierte ich mich im Wintersemester 1954 an der Medizinischen Fakultät der Universität München und bestand dort im Wintersemester 1956/57 die ärztliche Vorprüfung. Während der klinischen Semester studierte ich ebenfalls an der Universität München, wo ich mich im Frühjahr 1960 dem Medizinischen Staatsexamen unterzog.

